 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.02.19 J South Med Univ, 2015, 35(2): 252-255

基础研究

后肢制动对肌梭传入放电活动的影响

赵雪红[1],张文静[1],周 茜[1],高 艳[1],樊小力[2],刘广斌[3]
[1]湖北文理学院医学院机能学部,湖北 襄阳 441053;[2]西安交通大学医学院生理教研室,陕西 西安 710061;[3]南昆士兰大学生物和物理科学系,图文巴,昆士兰 澳大利亚

摘要:目的 观察后肢制动不同时期单一肌梭感觉末梢放电活动的改变。**方法** 石膏固定建立大鼠后肢制动模型,雌性大鼠随机分为后肢制动3 d组、7 d组、14 d组及对照组。用空气隔绝法,观察制动不同时期单一肌梭的自发放电、0.05 mg/ml琥珀酰胆碱灌流及牵拉至伸长位后肌梭放电活动的改变。**结果** 后肢制动3 d肌梭的自发放电活动和对琥珀酰胆碱灌流的反应明显降低(分别为$P<0.01$和$P<0.05$),制动14 d后伸长位肌梭的传入放电频率降低($P<0.01$)。单个动作电位时程也随着制动时间的延长而显著延长($P<0.01$)。**结论** 后肢制动可致肌梭的传入放电活动减少,这可能与肌梭自身收缩特性的改变有关。
关键词:肌梭;梭内肌纤维;后肢脱负荷;制动;放电

Changes in muscle spindle afferent discharge activities in rat soleus following hindlimb immobilization

ZHAO Xuehong[1], ZHANG Wenjing[1], ZHOU Xi[1], GAO Yan[1], FAN Xiaoli[2], LIU Guangbin[3]
[1]Department of Medical Function, Medical College of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China; [2]Department of Physiology, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, China; [3]Department of Biological and Physical Sciences, University of Southern Queensland, Toowoomba, Queensland, Australia

Abstract: Objective To investigate the changes in the afferent discharge activities of the sensory nerve endings in muscle spindles of rats with hindlimb immobilization. **Methods** Plaster cast was used immobilize the hindllimbs of rats. Using air-gap technique, the spontaneous discharge of the muscle spindles and its responses to perfusion with succinylcholine (0.05 mg/ml) and suspension in an extended position were observed in isolated muscle spindles from rats with hindlimb immobilization for 3, 7, and 14 days. **Results** The muscle spindles of rat soleus showed a sharp decrease in spontaneous discharge frequency ($P<0.01$) and response to succinylcholine perfusion after 3 days of hindlimb immobilization ($P<0.05$). Significant changes of the firing rate in an extended position was observed in rats after a 14-day immobilization ($P<0.01$). The duration of individual spikes was significantly prolonged following hindlimb immobilization ($P<0.01$). **Conclusion** Muscle spindle discharges decrease significantly in rats following hindlimb immobilization, which might be related to reduced contractile properties of the muscle spindle.
Key words: muscle spindle; intrafusal fibre; hindlimb unloading; immobilization; discharge

临床资料和动物实验表明,运动减退、制动均可使骨骼肌出现明显的废用性萎缩[1-2]。肌梭是骨骼肌内的一种牵张感受器。在自然生理状态下,由于受到重力作用的影响,肌梭会不断地产生传入冲动,从而维持肌紧张并参与对随意运动的调节。在脱负荷条件下,肌梭的生理性刺激减少甚至消失,肌梭自身的活动必然会发生相应的改变。由于肌梭的Ia类传入纤维与脊髓前角α运动神经元形成单突触联系,因此肌梭的活动成为α运动神经元电活动的基础,进而影响梭外肌的功能状态。有研究表明,制动条件下肌梭的结构确实发生了改变,但肌梭功能活动到底发生什么改变至今还未见报道[3]。在体的肌梭活动受梭外肌、γ-运动神经元及高位中枢功能状态的影响。利用单一肌梭进行研究就排除了其他组织对它的影响,已经成为研究肌梭功能活动的重要手段[4-5]。本研究用分离单一肌梭的方法,观察后肢制动不同时期肌梭活动的变化,并分析其可能的机制,旨在探明肌梭在废用性肌萎缩发生中的作用,从而为废用性肌萎缩的发生机制提供新的资料。

收稿日期:2014-10-12
基金项目:国家自然科学基金(31300981);湖北省自然科学基金(2012FFC05601);湖北文理学院科研项目(2012ya006)
Supported by National Natural Science Foundation of China (31300981).
作者简介:赵雪红,博士,讲师,E-mail: xuehong_zhao@163.com
通信作者:樊小力,教授,电话:029-82655438,E-mail: fanxl@mail.xjtu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

实验选用健康雌性Sprague-Dawley品系大鼠32只(西安交通大学医学院实验动物中心提供),体质量220~250 g。按体质量配对原则随机分为4组:制动3 d组、制动7 d组、制动14 d组和正常同步对照组,每组8

只。所有实验动物单笼喂养,能够自由活动与进食、进水。室温保持在20~25 ℃,人工控制动物室内照明,每昼夜均保持12 h光明与黑暗交替循环。

1.2 后肢制动模型的建立

制动组大鼠采用改良后Booth FW和Kelso JR方法建立大鼠后肢制动模型[6-7]。具体方法:动物用水合氯醛(0.4 g/kg,腹腔注射)麻醉,在其左侧后肢的踝关节、膝关节及腹股沟等血管容易受压处衬一层薄厚适宜的棉垫,然后用石膏绷带由踝关节向上缠绕至大腿与腹股沟处,将动物后肢固定在缩短位。在石膏层的外面用一层铜网保护,在铜网的外面再缠绕一层石膏绷带,最后在最外层的石膏上涂抹饱和苦味酸与辣椒素的混合液,以防止动物咬毁石膏。

1.3 单一肌梭分离

用20%乌拉坦麻醉实验动物,分离比目鱼肌,在双目解剖显微镜下以其呈梭形膨大的赤道部和较强的折光性辨认肌梭。用分离针去除肌梭周围与之相连的梭外肌纤维、血管等组织,完整地分离出单一肌梭,并保留其神经纤维,长度为1~2 mm以上。

1.4 肌梭传入放电活动记录

在双目解剖显微镜下,将肌梭放入灌流槽内,采用改良的空气隔绝法记录单一肌梭的传入放电活动[8-9]。信号放大后经CED 1401进行数模转换、存储,以便于分析。

肌梭标本制备好30~60 min后进行实验。首先在自然长度下观察肌梭自发放电活动1000 s,给于0.05 mg/ml琥珀胆碱灌流,待放电活动稳定后记录1 min,随后将肌梭两端用组织胶固定于伸长位,维持5 min,观察肌梭放电,计算最后1 min内的肌梭的放电频率。如果拉长后肌梭仍无放电则放弃该次实验。

1.5 主要试剂和溶液(单位:mmol/L)

NaCl 138.8、KCl 4、$NaHCO_3$ 12、KH_2PO_4 1、$MgCl_2$ 1、$CaCl_2$ 2、葡萄糖11,pH 7.4。Suxamethonium Chloride 0.05 mg/ml。

1.6 数据采集及统计分析

所有数据先用Spike 2软件处理,然后用SigmaPlot 11.0软件作进一步的统计分析。实验数据以均数±标准差表示,组间比较采用One-way ANOVA并SNK-*q*检验进行分析,取$P<0.05$作为显著性差异的界值。

2 结果

2.1 后肢制动对大鼠单一肌梭感觉神经末梢动作电位的影响

如图1所示,在一次实验中可同时记录到3~4个幅度的动作电位,即表明有3~4个单位的放电,其中包含1个初级感觉末梢(波幅最大)和2~3个次级感觉末梢。肌梭感觉神经末梢动作电位最显著的特征是有明显的负后电位,每个动作电位复极化时相之后,紧跟着一个明显的后超极化时相,接着缓慢去极化,约4~6 ms之后逐渐恢复至静息水平。由于波形及负后电位持续时间长短的差异,不同动作电位的时程差别较大,但负波的时程均约为0.5 ms(从去极化开始到回到基线的时间)。后肢制动3 d,负波的时程明显延长($P<0.01$),且随着制动的时间延长负波的时程也延长。

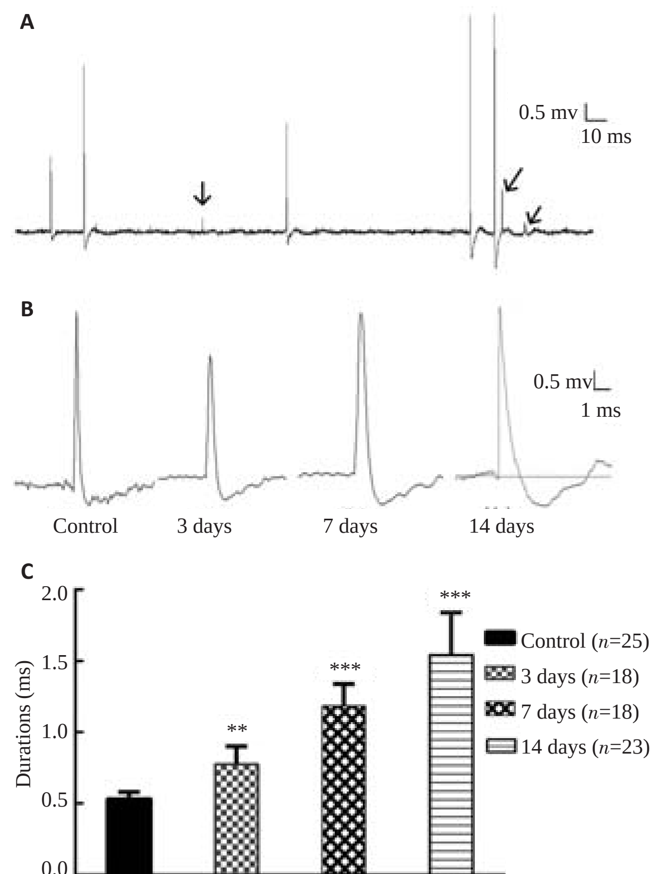


图1 后肢制动对感觉神经末梢动作电位时程的影响

Fig.1 Effect of hindlimb immoblization on duration of the action potentials. *A*: Afferent discharges in a muscle spindle sensory axon showing occasional abortive spikes (arrow); *B*: Individual action potentials during discharges in the control and immobilization groups; *C*: Durations of action potentials in the control and immobilization groups. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ *vs* control.

2.2 后肢制动对大鼠单一肌梭感觉神经末梢放电频率的影响

由于多个单位同时放电,而且空气隔绝法记录肌梭放电时动作电位的起始位点和记录位点之间的距离很近(约1 mm),传导时间的差异很小,导致不同单位的动作电位在时间上的叠加,形成异常的高波幅的复合波(图2)。同时还记录到多个波幅不等的局部阈下去极化

电位(图2中箭头所示)。由于每个肌梭的放电单位数量有差异及复合动作电位的出现,我们用计算每个肌梭中每个单位的平均放电频率来反应其放电活动。

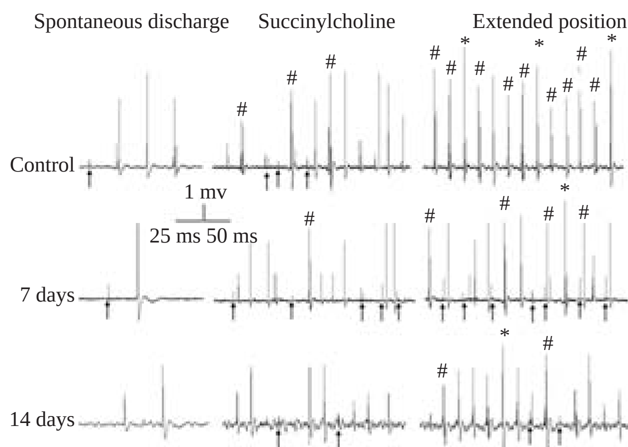


图2 肌梭放电原始图

Fig.2 Raw trace of muscle spindle discharges. Arrows indicate abortive spikes. *indicates the compound actions. # indicates synchronous discharge of several units.

2.2.1 *缩短位肌梭的放电活动* 在正常对照组大鼠共分离记录了27个单一肌梭的放电活动。正常对照组,肌梭有3~4个单位放电,同时有局部阈下去极化动作电位出现(图1、2中箭头所示)。在静息状态下,单一肌梭的自发放电频率很低,最典型的是在1000 s中仅有几个动作电位散在出现,平均53.29 ±12.63 impulses/1000 s。有2例无自发放电。后肢制动后,在静息条件下无自发放电的肌梭数明显增多。在3 d组,43个肌梭中25例无自发放电;在7 d组,36个肌梭中有18例无自发放电;14 d组,40个肌梭中有17例无自发放电。一个肌梭通常仅有一个初级末梢和0~2个次级末梢同时放电,有自发放电的肌梭的放电频率也明显减少(P<0.01,图3A)。0.05 mg/ml琥珀胆碱灌流5~15 min,肌梭的放电活动开始明显增加,无自发放电的肌梭开始有放电活动出现,但制动组的放电频率仍明显低于正常对照组(P<0.05,图3B)。

2.2.2 *伸长位单一肌梭放电活动* 将肌梭固定于伸长位后,所有肌梭均有连续的放电出现,放电频率为15~45 impulses/s,平均32.38±3.57 impulses/s(图2)。后肢制动3 d组和7 d组,放电频率下降,但无显著性差异(P>0.05)。制动14 d后,肌梭的放电频率下降为14.08±4.46 impulses/s,与正常对照组相比明显降低(P<0.01,图3C)。

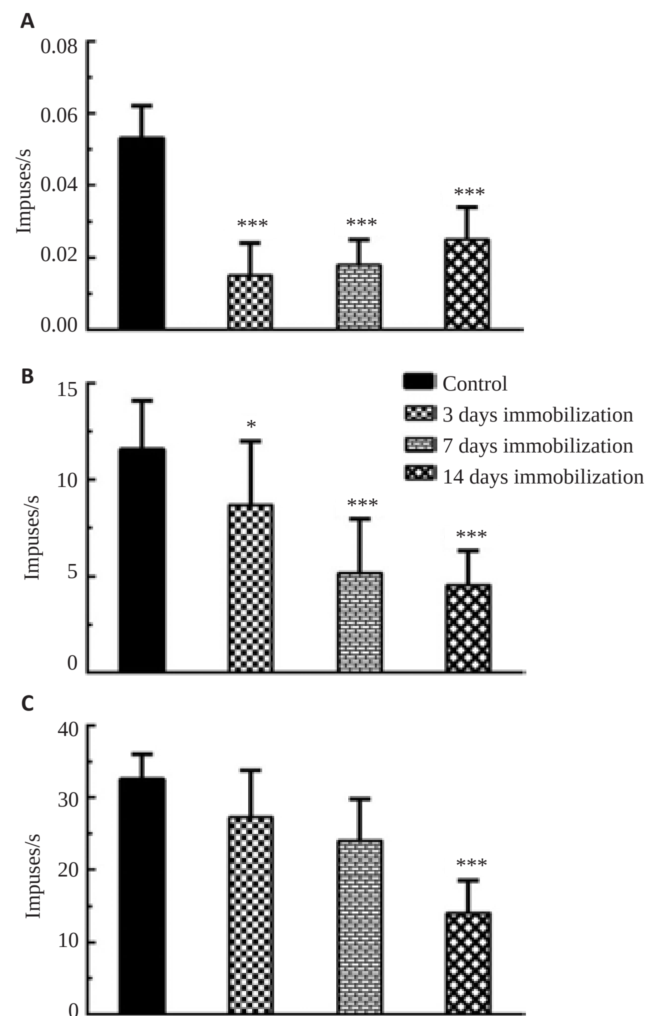


图3 后肢制动对肌梭传入放电频率的影响

Fig.3 Effect of hindlimb immobilization on isolated muscle spindle afferent discharge frequency in rats. *A*: Firing rate of spindles with spontaneous discharge; *B*: Firing rate of spindles perfused with Succinylcholine; *C*: Firing rate of spindles in the extended position. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 *vs* control.

3 讨论

研究资料表明,后肢脱负荷条件下,大脑皮层运动区、小脑蚓部等部位神经元的活性减弱[10-11]。这些中枢部位神经元活性的减弱,必将减弱对γ-传出活动的抑制。而后肢脱负荷的条件下,γ-运动神经元的形态结构无明显改变[12-13]。因此,梭内肌纤维的收缩功能和感觉末梢对牵拉的敏感性状态直接决定了肌梭传入放电活动。

在我们的前期研究中发现,后肢制动3 d后,梭内肌纤维的线粒体结构出现增生肿胀,7 d后肌细胞核出现核膜溶解、消失等改变;14 d后,肌小节的结构发生明显的改变。朱永进等[14]的研究发现,后肢脱负荷3 d后,大鼠比目鱼肌肌梭内Ca^{2+}荧光强度明显增加,提示游离Ca^{2+}浓度增加。无论是超微结构的改变还是Ca^{2+}的改变,都会影响到梭内肌纤维的收缩功能。本研究发现,后肢制动3 d后,肌梭的自发传入放电活动明显抑制,几乎所有肌梭在静息长度下无自发放电,7 d后少数肌梭出现少量的放电,14 d后肌梭的放电活动逐渐增加。肌梭的这种自发放电活动是由于梭内肌纤维自主的收缩引起的。因此,自发放电活动的降低,可能是梭内肌纤

维自主收缩活动减少引起的。琥珀胆碱是经典的肌梭兴奋剂,其机制是能够兴奋梭内肌纤维使其两极端收缩,模拟γ运动神经元的作用。本研究发现,制动后梭内肌纤维对琥珀胆碱的反应性降低。这种反应能力的降低,也提示梭内肌纤维的收缩能力降低。另一影响肌梭放电活动的因素是感觉神经末梢对牵拉刺激的敏感性。以往的形态学研究结果发现,肌梭感觉末梢的形态结构在后肢脱负荷早期并无明显改变,在后期才出现退行性改变[15]。本研究发现,后肢制动后肌梭对牵拉的反应在早期并无明显改变,而是在14 d后才出现明显降低。这与形态学的研究结果相一致。本研究的另一意外发现是,感觉末梢动作电位时程随制动时间的延长而延长,其具体机制还不清楚,有待于进一步的研究。

综上所述,在制动早期肌梭的自发性放电活动减少,而对牵拉的反应仅在制动14 d后才开始明显减弱。肌梭的自发放电是由于肌梭的收缩功能引起的;而对牵拉的反应,主要反映的是感觉末梢对牵拉刺激的反应能力。因此,我们推测肌梭自身收缩功能的降低可能是肌梭传入放电活动减少的始动因素。

参考文献:

[1] Kang C, Ji LL. Muscle immobilization and remobilization downregulates PGC-1α signaling and the mitochondrial biogenesis pathway[J]. J Appl Physiol , 2013, 115(11): 1618-25.

[2] Rannou F, Pennec JP, Morel J, et al. Na v1.4 and Na v1.5 are modulated differently during muscle immobilization and contractile phenotype conversion[J]. Appl Physiol, 2011, 111: 495-507.

[3] Józsa L, Kvist M, Kannus P, et al. Changes in the tension receptors of skeletal muscles after tenotomy and immobilization[J]. Morphol Igazsagugyi Orv Sz, 1989, 29(3): 179-85.

[4] Fischer M, Schafer SS. Effects of changes in pH on the afferent impulse activity of isolated catmuscle spindles[J]. Brain Res, 2005, 1043(1/2): 163-78.

[5] Querfurth H. Action-potential initiation and maintained activity of the isolated frog muscle spindle[J]. Eur J Neurosci, 2006, 24(4): 1147-56.

[6] Booth FW, Kelso JR. Production of rat muscle atrophy by cast fixation[J]. J Appl Physiol, 1973, 34(3): 404-6.

[7] 赵雪红, 樊小力, 宋新爱, 等. 100 Hz正弦波振动对制动大鼠比目鱼肌M波和H反射的影响[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2011, 40(5): 545-9.

[8] Ito F, Komatsu Y. Transduction and encoding mechanisms in muscle spindle[J]. Nagoya J Med Sci, 1980, 42(3-4): 37-48.

[9] 赵雪红, 樊小力, 宋新爱, 等. 大鼠单一肌梭的电生理特征[J]. 生理学报, 2011, 63(3): 281-5.

[10] D'amelio F, Fox RA, Wu LC, et al. Effects of microgravity on muscle and cerebral cortex: a suggested interaction[J]. Adv Space Res, 1998, 22(2): 235-44.

[11] Krasnov IB, Krasnikov GP. Cells in the vestibular and proprioceptive segments of rat. cerebellum following 14-day space flight [J]. Aviakosm Ekolog Med, 2009, 43(4): 43-7.

[12] Nagatomo F, Ishihara A, Ohira Y. Effects of hindlimb unloading at early postnatal growth on cell body size in spinal motoneurons innervating soleus muscle of rats[J]. Int J Dev Neurosci, 2009, 27 (1): 21-6.

[13] Roy RR, Matsumoto A, Zhong H, et al. Rat alpha-and gamma-motoneuron soma size and succinate dehydrogenase activity are independent of neuromuscular activity level[J]. Muscle Nerve, 2007, 36(2): 234-41.

[14] Zhu Y, Fan X, Li X, et al. Effect of hindlimb unloading on resting intracellular Calcium in intrafusal fibers and ramp-and-hold stretches evoked responsiveness of soleus muscle spindles in conscious rats[J]. Neurosci Lett, 2008, 442(3): 169-73.

[15] 朱永进, 吴苏娣, 樊小力, 等. 后肢去负荷对大鼠比目鱼肌肌梭神经末梢的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2006, 19(2): 95-8.

(编辑:黄开颜)